

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM



INTERNATIONALE ANMELDUNG VIKOPFENTLICHKEIT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/64

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/24195
(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juli 1999 (08.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/08425

(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Dezember 1998 (23.12.98)

(40) Prioritätsdaten:
197.57.740.7 23. Dezember 1997 (23.12.97) DE
198.49.265.0 26. Oktober 1998 (26.10.98) DE

(71) Anmelder für alle Bestimmungen außer (52): EVOITEC
BIOSTECHNICS AG (DE/DE), Schwanenburgerallee 114,
D-72525 Homburg (DE).

(72) Erfinder: und
(73) Erfinder/A anmelder (nur für (52): EIGEN: Manfred (DE/DE),
MPI für biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11,
D-37077 Göttingen (DE); WINKLER, Thorsten (DE/DE),
MPI für biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11,
D-37077 Göttingen (DE); STEPHAN, Jens (DE/DE), MPI
für biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11, D-37077
Göttingen (DE); SCHWILLE, Peter (DE/DE), MPI für
biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11, D-37077
Göttingen (DE); KOLTRMANN, André (DE/DE), MPI
für biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11, D-37077
Göttingen (DE); KETTLING, Ulrich (DE/DE), MPI für
biophysikalische Chemie, Am Fallberg 11, D-37077

Veröffentlicht:

Mit internationalen Recherchenbereichen bei
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist, Veröffentlichung wird widerholte falls Änderungen
erfolgen

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE).
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw., Postfach 10 22 41,
D-50662 Köln (DE).

(54) Titel: METHOD FOR DETECTING REACTIONS BY MEANS OF CONCURRENCE ANALYSIS

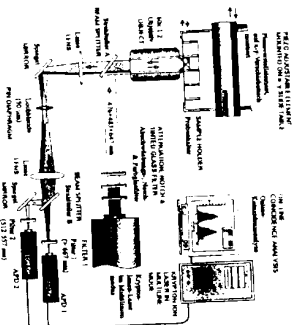
(54) Beschreibung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON REAKTIONEN MITTELS KONKURRENZZANALYSE:

(57) Abstract

The invention relates to a method for detecting reactions and concomitant changes of analytes in a sample by means of coincidence analysis, as follows: the sample is marked with at least two different fluorescent dyes and then illuminated with at least one laser in order to stimulate the emission of fluorescence; the fluorescence signals are detected by at least two detection units and each signal is broken down into any simultaneous time segments with the desired time slot widths; the number of signals contained in at least one time segment and/or the time intervals between signals in the time segments are detected; a coincidence analysis of the data detected is carried out for at least one time segment of the first detection unit with at least one simultaneous time segment of the second detection unit; statistics are provided showing the results of the coincidence analysis and/or the results are subjected to a threshold value analysis; and these statistics or a combination of these statistics are evaluated for the presence of characteristic features.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zum Nachweis von Reaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Konkurrenzanalyse, wobei die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wird, und zur Auswertung der Fluoreszenzemission von mindestens einem Laser beleuchtet wird, die Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden, und die jeweiligen Signale in beliebige, simultane Zeitelemente zerlegt werden, die Anzahl der in mindestens einem Zeitelement enthaltenen Signale ermittelt wird, und/oder die Zeitintervalle zwischen den Signalen in den Zeitelementen ermittelt werden, für mindestens einen Zeitelement der zweiten Detektionseinheit eine Konkurrenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem gleichzeitigen Zeitelement der ersten Detektionseinheit durchgeführt wird, eine Statistik der Resultate der Konkurrenzanalyse erstellt wird, und/oder die Resultate einer Schwellenwertanalyse unterzogen werden, diese oder eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von charakteristischen Merkmalen bewertet wird.



PCT veröffentlicht:

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbogen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem

LEHENDLICH ZUR INFORMATION

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GB	Großbritannien	LV	Lettland	SO	Sierra Leone
AZ	Aserbaidschan	GR	Griechenland	MD	Moldau	TD	Togo
BA	Bosnien und Herzegowina	CH	Schweiz	MG	Madagaskar	TM	Türkmenistan
BB	Barbados	CN	China	ML	Malawi	TR	Türkei
BE	Belgien	CU	Kuba	MR	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	DE	Deutschland	MT	Malta	UA	Ukraine
BJ	Benin	DK	Dänemark	MV	Malediven	UG	Uganda
BR	Brasilien	EE	Estland	MY	Malaysia	US	Verenigte Staaten von Amerika
BY	Belarus	IE	Irland	NZ	Neuseeland	UZ	Usbekistan
CA	Kanada	IS	Island	NI	Niger	VE	Venezuela
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NG	Nigeria	ZA	Südafrika
CG	Kongo	KR	Südkorea	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Schweiz	KG	Kirgisistan	PL	Polen		
CJ	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CM	Kamerun	KE	Kenya	RO	Rumänien		
CN	China	KG	Kirgisistan	RU	Russland		
CU	Kuba	LA	Laos	SD	Sudan		
CZ	Tschechien	LI	Liechtenstein	SG	Singapur		
DE	Deutschland	LU	Luxemburg				
EE	Estland						

VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON REAKTIONEN MITTELS KOINZIDENZANALYSE

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen mittels Konzidenzanalyse.

Das Auffinden von Molekülen mit spezifischen Eigenschaften, wie Bindungs-, Inhibitions- oder katalytischen Eigenschaften, ist eine zentrale Aufgabe in der Wirkstoffentwicklung und in biotechnologischen Anwendungen. Moleküle mit derartigen Eigenschaften können entweder entdeckt oder entworfen werden. In diesem Sinne bedeutet "Entdecken" die Isolierung und das Screening von Substanzen, während das molekulare Design auf rationale oder evolutive Techniken zurückgreift. Das rationale Design erfordert fundierte Einblicke in die molekulare Biophysik, um eine Vorhersage der Struktur-Funktion-Beziehung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu werden im evolutionen Design Prinzipien der Darwinischen Evolution auf molekularer Ebene angewendet und neue bzw. veränderte Moleküle durch eine Kombination von Mutation, Amplifikation und Selektion erzeugt. Die Anwendung evolutionärer Techniken in der Biotechnologie - sog. evolutive Biotechnologie - wurde von Eigen und Gardiner zu Beginn der achtziger Jahre vorgeschlagen (Pure Appl. Chem. 56, 967-978, 1984) und hat inzwischen eine breite Akzeptanz gefunden. Leider ist jedoch in vielen evolutionen Ansätzen der Prozeß der Selektion nicht unmittelbar an die Amplifikation geknüpft. Selektionsprozesse müssen daher oftmals künstlich eingeführt werden. Dies kann beispielsweise im

sog. Hochdurchsatzscreening (HTS) in Kombination mit einem geeigneten Assay erfolgen.

HTS-Prozesse unterliegen ökonomischen Beschränkungen. Zur Prozessierung einer Vielzahl von Proben ist es daher erforderlich, daß die Analysezeit der einzelnen Probe extrem gering ist. In den letzten Jahren erfolgten daher große Anstrengungen in der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung der Screeningtechnologie sowie in der Entwicklung von homogenen Assays und der Integration hochsensitiver und schnell arbeitender Detektionsvorrichtungen. Unter der Vielzahl alternativer Detektionsprinzipien haben fluoreszenzbasierende Techniken - wie Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), Fluoreszenzquenchung, Fluoreszenzpolarisierung, zeitaufgelöste Fluoreszenztechniken und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) - starken Anklang gefunden.

Im Rahmen der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie werden Fluoreszenzfluktuationen von einzelnen Molekülen eines insbesondere im Femtosekunden-Bereich liegenden Meßvolumenelementes gemessen und z. B. durch Evaluierung der Autokorrelationsfunktion der Einfarben-Fluoreszenzsignale molekulare Diffusionscharakteristiken ermittelt. Die Grundlagen der FCS und ihre Anwendung auf insbesondere biologische Fragestellungen sind in vielfältigen Artikeln und Patentanmeldungen beschrieben (z. B. Eigen und Rigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740 - 5747, 1994; WO 94/16313).

Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie oder sog. Zweifarben-FCS ist ebenfalls Gegenstand einiger Veröffentlichungen. Die Zweifarben-FCS wurde zu Beginn der neunziger Jahre von Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740 - 5747) vorgeschlagen und wird ebenfalls in der unter WO 94/16313 veröffentlichten internationalen Patentanmeldung erörtert. Applikationen dieser Technik bei der Untersuchung von Hybridisierungskinetiken wurden von Schwille et al

(Biophysical Journal, Vol. 72, 1878 - 1886, 1997) beschrieben. Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen der Fluoreszenzkreuzkorrelation zeigen, daß Analysezeiten von 30 bis 120 s notwendig sind, um eine hinreichend genaue Bestimmung der Amplituden der Kreuzkorrelationsfunktion und Diffusionszeiten zu ermöglichen. Derartig lange Analysezeiten sind nicht oder nur bedingt für ein Hochdurchsatzscreening geeignet.

In der Literatur sind ferner verschiedene Signalverarbeitungsverfahren beschrieben worden, um Signale vom Hintergrundrauschen zu trennen.

In Tellinghuisen et al. (Analytical Chemistry 66, No. 1, 64 - 72, 1994) wird ein Verfahren für die Fluoreszenz-Lebensdauerspektroskopie beschrieben, das dazu dienen soll, die von der Lichtquelle, in diesem Fall von einem Laser stammenden Photonen aus dem Gesamtsignal herauszufiltern. Dazu wird der Signalfrequenzstrom mit dem Triggersignal, d.h. dem Anregungspuls des gepulsten Lasers, verglichen. Kommt ein Photon im Rahmen der Lichtgeschwindigkeit zeitgleich mit dem Anregungspuls an, so wird es als Streulichtpuls identifiziert und gelöscht.

In Keller et al. (Applied Spectroscopy 50, No. 7, 12A - 32A, 1996) wird ein weiteres Verfahren für die Analyse von Fluoreszenzlebensdauern beschrieben. In diesem Verfahren werden die Zeitdifferenzen zwischen am Detektor eintreffenden, zeitlich aufeinanderfolgenden Impulsen bestimmt, indem die Anzahl von Triggerpulsen, die mit 100 kHz erzeugt werden, zwischen zwei aufeinanderfolgenden Photonen gezählt wird. Diese Zahlen werden in aufeinander folgenden Kanälen eines MCS (engl. "multichannel scaler") gespeichert. Anschließend wird dieses MCS-Signal einer zeitlichen, schnellen Fouriertransformation (FFT) zur Glättung unterworfen. Liegen nach der FFT wenigstens 5 Zeitdifferenzen des geglätteten Signals unterhalb eines visuell bestimmten Schwellenwertes, so wird das Signal für die gesamte Zeitdauer, während der die Zeitdifferenzen kontinuierlich unterhalb des visuell bestimmten

Schwellenwertes liegen, als zusammengehörig erachtet und als Fluoreszenzanteil, im wissenschaftlichen Sprachgebrauch seit einiger Zeit "burst" genannt, bewertet. Anschließend wird das so gefilterte Signal in bezug auf die Fluoreszenzlebensdauer ausgewertet. Allerdings verwenden die Autoren hier nur Signaleanteile, bei denen mehr als 25 Zeitdifferenzen unterhalb des visuell bestimmten Schwellenwertes liegen.

Aufgabe der folgenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, welches bei kleinsten Probenvolumina eine zuverlässige und schnelle Detektion von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- und Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen ermöglicht.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Die weiteren Patentansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Koinkidenzanalyse, wobei

- die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
- die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
- die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Mehrvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden.

die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale oder hiervon abgeleitete Zeitspuren in beliebiger, im wesentlichen jedoch simultane, Zeitabschnitte mit frei wählbaren Zeitkanalbreiten zerlegt werden.

Die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden.

Für mindestens einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Konzidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem im wesentlichen zeitgleichen Zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird.

Mindestens eine Statistik der Resultate der Konzidenzanalyse erstellt wird, und/oder die Resultate einer Schwellwertanalyse unterzogen werden.

Diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, daß die Zeitkanalbreiten größer als die längste Fluoreszenzlebensdauer der mindestens zwei Farbstoffe sind und/oder die Zeitkanalbreiten kleiner als die Durchtrittszeit des mindestens einen Probenmoleküls durch das Meßvolumen sind.

Die Detektionseinheiten sollten in einer bevorzugten Ausführungsform unterschiedliche spektrale Detektionsempfindlichkeiten aufweisen.

Weiterhin sollte das Meßvolumenelement $V \leq 10^{-12}$ l betragen.

Es kann weiterhin bevorzugt sein, die Probe mittels eines Lasers zu beleuchten, der elektromagnetische Strahlung mindestens einer Wellenlänge emittiert, die geeignet ist, die mindestens zwei in der Probe enthaltenen Farbstoffe anzuregen. Es ist jedoch

auch möglich, Laser zu verwenden, die mehr als eine Wellenlänge emittieren, oder mehrere Laser zur Anregung der Fluoreszenzemission einzusetzen.

Es kann ebenfalls bevorzugt sein, daß die Konzidenzanalyse online durchgeführt wird und/oder die Zeit zur Durchführung der jeweiligen Messung während der Messung individuell angepaßt wird.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, im Rahmen der Konzidenzanalyse die Konzidenz durch Bestimmung der Amplitude $G(0)$ der Kreuzkorrelationsfunktion zu ermitteln.

Es kann ebenfalls bevorzugt sein, im Rahmen der Konzidenzanalyse die Konzidenz durch logische UND-Verknüpfung zu ermitteln.

Weiterhin kann es wünschenswert sein, die Konzidenz durch Multiplikation gemäß nachfolgender Formel zu ermitteln:

$$K_i(n) = \frac{\sum_j N(m, j)}{\prod_j N(m, j)^{n^{(i-1)}}}$$

wobei $N(m, j)$ die Anzahl Photonen im Zeitabschnitt m des Detektors j , i die Gesamtzahl der verwendeten Detektionseinheiten und n die Anzahl der Zeitabschnitte innerhalb der Zeitspur bezeichnet.

Es kann auch wünschenswert sein, daß Probenvolumen und Meßvolumen relativ zu einander bewegt werden.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, Systeme zu untersuchen, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet.

Vorzugsweise umfaßt die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst die Markierung der zu untersuchenden Probenmoleküle durch mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte und /oder einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten.

Die spektral unabhängigen Emissionsstrahlungen der mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe werden in einem konfokalen Nachweisverfahren auf unabhängigen Detektoren detektiert, wobei vorzugsweise jedem Farbstoff ein Detektor zugeordnet wird. Die auf den Detektoren erzeugten Photomensignale werden von einer Meßkarte simultan in genauso vielen Zeitspuren wie Detektoren aufgenommen und vorzugsweise parallel bzw. simultan mit frei wählbaren Zeitskalenbreiten gerastert. Es werden somit bevorzugt synchronisierte Zeitsachsen bereitgestellt, die in frei wählbare Zeitskanäle unterteilt sind und in welchen die Photomensignale je nach zeitlichem Eintreffen gespeichert werden.

Es wird erfindungsgemäß die über das statistische Mittel hinausgehende Häufigkeit an koinzidiert in den synchronisierten Zeitspuren auftretenden Signalen mittels eines geeigneten Algorithmus berechnet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird diese Koinzidenz K_i durch eine normierte Multiplikation der verwendeten i Detektorkanäle mit frei wählbarer zeitlicher Auflösung berechnet. Hierzu werden bevorzugt jeweils zeitgleiche Kanäle dieser Zeitspuren der verwendeten spektral getrennten Detektorkanäle $j = 1, \dots, i$ miteinander multipliziert, anschließend die Summe über alle Produkte gebildet und diese normiert und mit der Gesamtzahl n der in einer Zeitspur enthaltenen Zeitskanäle bzw. Zeitabschnitte multipliziert.

$$K_i(n) = \frac{\sum_j N(m, j)}{\prod_j N(m, j)} \cdot n^{i-1}$$

Hierbei bezeichnet $N(m, j)$ die Anzahl Photonen im Zeitskanal m des Detektors j , i die Gesamtzahl der verwendeten Detektorkanäle bzw. Detektoreinheiten und n die Anzahl der Zeitskanäle bzw. Zeitabschnitte innerhalb der Zeitspur.

Der so erhaltene Wert K ist ein mögliches Bewertungsmaß für die untersuchte Probe. Für völlig voneinander unabhängige Signale ist $K=1$. Werden in den mindestens zwei Zeitspuren über das Zufallsmaß hinausgehend zeitgleich Photonen detektiert, ist $K>1$. Je höher K über 1 liegt, desto mehr Koinzidenzen in den beiden Zeitspuren treten auf, d. h. desto mehr Probenmoleküle mit mindestens zwei Farbstoffen werden detektiert. In Abbildung 9 ist dieses Meßprinzip am Beispiel einer Probe, die zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe enthält, verdeutlicht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es somit nicht notwendig eine Korrelation durchzuführen, wie es z. B. eine fundamentale Voraussetzung für die Einfarben-FCS ist. Gleichzeitig erübrigt sich das für die FCS unerlässliche Anfitzen der Meßkurven. Weiterhin kann so die anfallende Menge an Daten auf das Minimum von einem Wert pro Probe reduziert werden (z. B. ist K_{i-1} direkt proportional zur Konzentration an doppelt markierten Molekülen).

Ein besonders hervorzuhebender Vorteil für die Entwicklung von homogenen Assays auf der Basis des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die generelle Anwendbarkeit und Flexibilität der Methode. Das Targetdesign beispielsweise für konventionelle Einfarben-FCS ist limitiert durch die Notwendigkeit, positive und negative Proben über die Diffusionszeiten der fluoreszenten Moleküle zu unterscheiden. Andere Fluoreszenztechniken wie FRET oder Fluoreszenzquenchung sind dadurch

eingeschränkt, daß zwei Fluorophore sich in geeigneter räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Sie können jedoch zum Nachweis von Konformationsänderungen durchaus geeignet sein. Fluoreszenzpolarisation erfordert eine veränderte Fluorophorflexibilität, um eine Reaktion detektieren zu können. Auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende Assays unterliegen nicht diesen Limitationen. Das Screening auf enzymatische Aktivität sowie auch auf Inhibitoren enzymatischer Prozesse wird entscheidend vereinfacht. Unter Anwendung der Prinzipien der evolutionären Biotechnologie in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und neuen Mutagenesetechniken eröffnen sich Möglichkeiten für das Design bzw. die Optimierung einer Vielzahl katalytischer Funktionen.

Abhängig von der gewünschten Toleranz für falsch-positive bzw. falsch-negative Resultate ist es möglich mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens Analysezeiten von weit unter 1 s zu erzielen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein Echtzeitprotokoll, so daß ein *on-line* Fitting während der Messung möglich ist. Im Falle des Screenings auf Restriktionsendonukleaseaktivität sollten i.d.R. die meisten Proben negativ sein, da eine spezifische Enzymaktivität in einer beliebigen Library ein relatives seltenes Ereignis darstellt. Bei Verwendung einer Gaußschen Funktion für positive Proben und Festsetzung einer Toleranzschwelle, welche die Anzahl nicht-identifizierter positiver Proben in einem Screeninglauf definiert, kann ein Schwellwert für die Koinzidenz für eindeutige negative Proben definiert werden. Alle Proben mit einem Koinzidenzwert unterhalb dieses Schwellwertes können unmittelbar einer weiteren Analyse mit derselben Analysezeit zugeführt werden. Es resultiert somit eine verdoppelte Analysezeit, für die wiederum ein Schwellwert definiert wird. Da die Verteilungsfunktionen bei Vielfachen dieser Analysezeit signifikant besser separiert sind, werden die meisten Proben als falsch-positive identifiziert. Positive Proben werden nochmaligen Analysen zugeführt, bis die gewünschte Signifikanz erreicht ist. Es ist somit möglich, mit im Einzelfall zu bestimmenden Analysezeiten

unter Zugrundelegen eines gewünschten Signifikanzniveaus eine adaptive Auswertung durchzuführen (siehe z. B. Figuren 5 und 8).

Das erfindungsgemäße Verfahren und seine Ausführungsformen zeichnen sich durch folgende Vorteile aus:

Bei Erzeugung eines zweifarbigigen Anregungslichtes in nur einer Lichtquelle wird ein geringerer Justageaufwand erforderlich. Es ergibt sich eine Erhöhung der Stabilität bezüglich der Deckungsgleichheit der beiden konfokalen Volumenelemente. Störende Wellenlängen außerhalb der spektralen Anregungsbereiche bzw. innerhalb der Emissionsbereiche der beiden Marker-Fluorophore können durch geeignete optische Filter herausgefiltert werden. Eine Anpassung der relativen Intensitäten und Strahldurchmesser für beide Farben kann ebenfalls unter Verwendung geeigneter Filter und Lochblenden erfolgen.

Ein grundlegender Vorteil des beschriebenen Verfahrens ist die Möglichkeit der sehr schnellen Charakterisierung. Bisher erreichte Meßzeiten liegen im Bereich von wenigen Millisekunden pro Probe. Für die Ermittlung des Meßwertes K ist die fundamentale untere zeitliche Grenze die Lebensdauer der verwendeten Fluorophore, im Gegensatz etwa zur Fluoreszenz-Korrelationsanalyse, wo die Beschränkung durch die Durchtrittszeit der zu untersuchenden Biomoleküle durch das Meßvolumen (=Diffusionszeit) gegeben ist.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens der Koinzidenz-Analyse liegt in der Möglichkeit der Auswertung der Meßdaten während der Datenaufnahme (*on-line*) mit Hilfe einer geeigneten Meßwertentlassungs-/Prozessorbarte. Im Gegensatz z. B. zur Fluoreszenz-Korrelationsanalyse entfällt eine mathematische Modellierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Meßzeit online angepaßt. Dieser adaptive Meßzeitalgorithmus ermöglicht eine weitere Reduzierung der Gesamtmeßzeit. Vorzugsweise bei Zeiten, die kürzer sind als die mittlere notwendige Meßzeit wird die Eindeutigkeit des Ergebnisses geprüft. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß geprüft wird, ob der zu diesem Zeitpunkt ermittelte Koinzidenzwert eindeutig einem Ereignis, d. h. z. B. einer in Figur 7 bzw. Figur 8 dargestellten Gaußverteilung für positive oder negative Proben zugeordnet werden kann. Alle Proben mit einem Koinzidenzwert unterhalb oder ggf. oberhalb eines festzulegenden Schwellenwertes können unmittelbar einer weiteren Analyse zugeführt werden. Diese Angabe eines bestimmten Signifikanzniveaus kann ebenfalls zu einer erheblichen Verkürzung der Meßzeit führen.

Es entfallen ebenfalls experimentelle Routinen zur Kalibrierung des Systems wie sie z. B. bei der Fluoreszenz-Korrelationsanalyse notwendig sind.

In einer weiteren Ausführungsform wird die für die Koinzidenzanalyse nötige Fluoreszenzfluktuation durch eine kontrollierte Bewegung der Probenmoleküle relativ zum konfokalen Volumen bewirkt. Technisch wird dies entweder durch eine Bewegung der Probe (Beaufschlagung von Schwingungen oder Induktion eines Flusses) bei stationärer Optik, oder durch Bewegung des Meßfokus in der stationären Probe (konfokales Scanning), oder durch eine Kombination von beidem erreicht. Gegenüber den in der FCS üblichen Fluktuationen aufgrund molekularer Diffusion erlaubt die kontrollierte Bewegung die gezielte Einstellung der für die Fluoreszenzdetektion optimalen Aufenthaltsdauer eines Moleküls im Fokus. Damit läßt sich die Anzahl der Fluktuationen pro Zeiteinheit gezielt erhöhen, was eine deutliche Steigerung der Signalgüte mit sich führt. Zusätzliche Effekte bestehen in der Vergrößerung des effektiven Meßvolumens, was u. a. die Sensitivität der Methode erhöht und zur Reduktion des Photobleichungs führt, sowie in der Vereinheitlichung

der Aufenthaltsdauer im Meßfokus für verschiedene Moleküle, was die Signalstreunung reduziert.

Demonstriert wurde die Variante einer gesteuerten Bewegung der Probe bei stationärer Optik in Form der Beaufschlagung von Schwingungen. Hierzu wurde der Probenträger an einen piezoelektrischen Positioniertisch montiert und z. B. mit Frequenzen bis zu 250 Hz oszillierend in der Raumebene senkrecht zur optischen Achse bewegt. Bereits bei Frequenzen zwischen 100 und 200 Hz ergab sich ein deutlich erhöhtes Signal-zu-Hintergrund Verhältnis mit einer damit einhergehenden Verringerung der für eine Bewertung notwendigen Meßzeit.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die zeitliche Breite der Zeikanäle und die Frequenz der periodischen Relativbewegungen die Meßwerte vorteilhaft beeinflussen können. Es zeigte sich (Figur 10), daß die Zeitanalbreite vorzugsweise größer als die Tripletzustand-Lebensdauer der Fluorophore und/oder kleiner als die mittlere Durchtrittszeit der Moleküle durch das Meßvolumen gewählt werden sollte.

Ein weiterer, fundamentaler Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens der Koinzidenz-Analyse besteht in der Möglichkeit, auch Systeme untersuchen zu können, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet. Untersucht man solche Systeme z. B. mit der Fluoreszenz-Korrelationsanalyse, in welcher die Diffusionszeiten bestimmt werden, so führt dies zu Problemen in der Eindeutigkeit der Unterscheidung. Im erfindungsgemäßen Verfahren durch die Bestimmung der Koinzidenz zwischen Zeitspuren von spektral getrennten Detektoren ist hingegen eine eindeutige Unterscheidung möglich.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Koinzidenz auch durch Bestimmung der Amplitude $G(t)$ der Kreuzkorrelationsfunktion erfolgen. Die Amplitude $G(t)$ reicht aus, Aussagen über die Konzentration

des zu untersuchenden Molekuls machen zu können und so, wie z. B. in dem Ausführungsbeispiel 1 und in Figur 5 dargestellt, die Aktivität einer Restriktionsendonuklease zu bestimmen.

Die Koinzidenzanalyse kann in einer weiteren Ausführungsform auch durch ein logisches UND bzw. Multiplikationsglied auf Hardwareebene realisiert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich darüber hinaus auch die Substratkonzentration bis in den subpicomolaren Bereich verringern.

Figur 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysezeiten erhalten wurden.

Figur 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationspunkte und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität erhalten wurden.

Die in Figur 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der evaluierten Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von Lochblenden unterschiedlichen Durchmessers erhalten wurden.

Figur 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität.

Figur 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restriktionsendonukleaseaktivität unter Bestimmung des Parameters $G(0)$.

Figur 6 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform des optischen Aufbaus unter Verwendung eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationspektrometers.

Fig. 7 zeigt wie durch das erfindungsgemäße Verfahren die Meßzeiten deutlich verringert werden können.

Fig. 8 zeigt den Einfluß der Meßzeit auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität.

Fig. 9 zeigt schematisch ein Meßprinzip.

Fig. 10 zeigt die Bedeutung der zeitlichen Breite der Zeitkanäle und der Frequenz der periodischen Relativbewegung für die Koinzidenzanalyse.

Fig. 11 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform des optischen Aufbaus mit einer Vorrichtung zur Bewegung der Probe in Form einer Beaufschlagung mit Schwingungen

Figur 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysezeiten erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 nM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0.25 U/µl EcoRI (untere dünne Linien) bzw. ohne Zusatz von Enzym (obere Linien in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betragen 760 ms (gepunktete Linien) und 120 s (durchgezogene Linien). Die verwendete Lochblende wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betragen 19 kW/cm² (488 nm) bzw. 15 kW/cm² (633 nm). Die bei kurzen Analysezeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve

ist vertrauslicher als die bei langen Analysezeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve. Dennoch stimmen die charakteristischen Diffusionszeiten und Partikelzahlen hinreichend überein, um die Aussage zu erlauben, daß die erhaltenen Kurven dieselbe Information enthalten.

Figur 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationswerte τ und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 1 nM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl EcoRI (untere dünne Linie) bzw. mit 0,25 U/µl HindIII (obere Linie in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betragen 1,6 s. Die verwendete Lochblende wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betragen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31 kW/cm² (633 nm). Es zeigt sich, daß die Standardabweichungen bei τ -Werten unterhalb von 0,01 ms drastisch erhöht sind.

Die in Figur 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der evaluierten Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von Lochblenden unterschiedlichen Durchmessers erhalten wurden. Die Balken bezeichnen die Anzahl der $G(0)$ -Werte, die in einer Binweite von 0,0015 (30 µm), 0,0026 (10 µm) bzw. 0,00062 (60 µm) liegen. Der Hauptteil der Abbildung zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (gepunktete Balken) bzw. ohne (durchgezogene Balken) enzymatische Aktivität bei optimalem Lochblendendurchmesser (30 µm); der Überlapp zwischen den Gauß-Kurven beträgt hier 0,6 %. Er beträgt 2,4 % bei einem Lochblendendurchmesser von 10 µm bzw. 3,4 % bei einem Lochblendendurchmesser von 60 µm. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 nM gelabeltem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl EcoRI (gepunktete Balken) bzw. mit 0,25 U/µl HindIII (durchgezogene Balken) inkubiert wurde. Die Korrelationszeiten betragen 1,6 s. Die Anregungsintensitäten betragen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31

kW/cm² (633 nm). Der ermittelte optimale Lochblendendurchmesser reflektiert offenbar den Kompromiß zwischen der Zunahme der Detektionseffizienz mit zunehmendem Lochblendendurchmesser (bedingt durch eine erhöhte Aufenthaltsdauer der Fluorophore im Fokus) und der Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses mit zunehmendem Lochblendendurchmesser (bedingt durch einen erhöhten Fluoreszenzuntergrund).

Figur 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität. Die Assays wurden wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben unter Verwendung eines Lochblendendurchmessers von 30 µm durchgeführt. Die Separation der Verteilungsfunktionen erhöhte sich mit zunehmender Konzentration.

Figur 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restriktionsendonukleaseaktivität. Die Proben wurden zyklisch gescreent (insgesamt 500 Messungen). Der linke Teil der Figur 5 zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (BamHI, offene Balken) und ohne (HindIII, schwarze Balken) spezifische Endonukleaseaktivität bei Analysedauern von 760 ms (1a), 1,6 s (2a), 3,6 s (3a) und 7,6 s (4a). Die Verteilungsfunktionen der Kreuzkorrelationsamplituden $G(0)$ wurden wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben evaluiert. Die Binweite betrug 0,0015. Der rechte Teil der Figur 5 verdeutlicht die Separationseffizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Gauß-Fitting bei reinem Substrat (durchgezogene Linie), HindIII (durchgezogene Linie in Fettdruck), reinem Substrat (durchgezogene Linie), BamHI (gepunktete Linie) und SspI BamHI (gepunktete Linie in Fettdruck), EcoRI (gepunktete Linie) und SspI (gestrichelte Linie). Der Überlapp betrug 2,6 - 5,4 % (760 ms), 0,1 % (1,6 s), < 0,002 % (3,6 s) bzw. < 10⁻⁶ % (7,6 s). Die Assays wurden in einem Volumen von 5 µl unter Verwendung von 10 nM gelabeltem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl HindIII, 0,1 U/µl BamHI, 0,25 U/µl EcoRI, 0,08 U/µl SspI bzw. ohne Zugabe von Enzym inkubiert wurde. Die Anregungsinten-

stäten betragen 19 kW/cm^2 (488 nm) und 15 kW/cm^2 (633 nm). Der Lochblenden-durchmesser betrug $30 \text{ }\mu\text{m}$. Es zeigt sich, daß mit zunehmender Analysenzeit die Verteilungsfunktionen schmaler wurden und somit die Mittelwerte klar zu separieren sind.

Figur 6 zeigt den optischen Aufbau eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationspektrometers. Zwei parallele Laserstrahlen eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) passieren ein Wassermersionsobjektiv ($40\times$, $N.A. = 1.2$) in einem Epi-Illuminationsaufbau, so daß die zwei übereinandergelagerten foci in der Probe ein konfokales Meßvolumenelement in der (Höhenordnung von Femtolitern bilden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt, mittels dichroitischen Spiegel vom Anregungsstrahlengang separiert und mittels einer Linse auf eine Lochblende fokussiert. Die Lochblende variablen Durchmessers ist in der Bildebene der Linse angeordnet und kann in x-, y- und z-Richtung justiert werden. Die Fluoreszenzmission wird parallelisiert, durch einen dichroitischen Spiegel in eine grüne und rote Fraktion separiert und auf zwei Avalanche-Photodioden refokussiert.

In Figur 7 wurde eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens eingeführt, welche zu einer gesteuerten Bewegung der Probe bei stationärer Optik in Form einer Beaufschlagung von Schwingungen verwendet wurde. Hierzu wurde der Probenträger an einen piezoelektrischen Positioniertisch montiert und entsprechend oszilliert. Es wurden Proben eingesetzt, die 10 nM doppelsträngiges DNA-Substrat enthielten und denen ferner in einer Ausführungsform Restriktionsendonuklease FcoRI zugesetzt wurde oder in einer anderen Ausführungsform kein solches Enzym zugesetzt wurde. Der obere Teil der Abbildung zeigt, daß bei einer Analysenzeit von 50 ms (je 3900 Messungen, Frequenzen $75 \text{ Hz}(x)$ und $49 \text{ Hz}(y)$) ein Überlapp zwischen Signalen der beiden verschiedenen Probentypen von ca. 3% erzielt werden konnte. Im unteren Teil der Abbildung zeigt sich, daß bei einer Analysenzeit

von 100 ms (je 1800 Messungen, Frequenzen $75 \text{ Hz}(x)$ und $49 \text{ Hz}(y)$) ein Überlapp von sogar nur $0,4\%$ erzielt werden konnte. Somit ist deutlich gezeigt, daß unter Anwendung einer erzwungenen Bewegung der fluoreszierenden Partikel eine Verkürzung der Meßzeit und eine erhöhte Datengenauigkeit erreicht werden kann.

In Figur 8 sind Histogramme aus jeweils 300 Messungen des Koinkidenzwertes für Proben aus reinem Substrat (10 nM zweifach markierte Doppelstrang-DNA, schwarze Balken) und bereits durch Restriktionsendonuklease geschnittene Probe (10 nM zweifach markierte Doppelstrang-DNA, gepunktete Balken) bei einer Oszillationsfrequenz von 216 Hz dargestellt. Die Abbildungen A-D zeigen verschiedene Analysenzeiten. Die Verteilungen wurden durch eine Gaußfunktion angefitet. Zur Bestimmung des Meßfehlers wurden die Standardabweichungen und der Überlapp der Fitfunktionen bestimmt.

Figur 9 illustriert schematisch ein Meßprinzip. In der linken Spalte diffundieren unterschiedliche Farbstoffe unabhängig durch die Probenlösung. Das jeweilige Auftreten eines Farbstoffes im Meßvolumen ist daher unabhängig von dem Verhalten des anderen Farbstoffs, und die Photonenergebnisse in einer Zeitspur sind statistischer Natur und vollkommen unabhängig von den Photonenergebnissen, die in der anderen Zeitspur aufgenommen werden. Der Koinkidenzwert in solch einem Falle ist genau $K=1$. In der rechten Spalte sind beide Farbstoffe aneinander gebunden und diffundieren nun gemeinsam durch die Probenlösung. Tritt der Komplex im Meßvolumen auf, so werden in den beiden Meßspuren zeitgleich (d.h. im selben Zeitkanal m) Photonenergebnisse registriert. Diese Abhängigkeit der Signale aus den unabhängigen, spektral getrennten Detektoren führt zu einer Häufung von Koinkidenzen (d.h. zeitgleich registrierten Photonen), welche über das statistische Maß voneinander unabhängiger Signale hinausgeht. Der Koinkidenzwert in solch einem Falle beträgt $K>1$. Je höher der Anteil von miteinander verbundenen verschiedenen Farbstoffen ist, desto mehr unterscheidet sich K von 1 .

In Figur 10 ist die Detektionsicherheit in Abhängigkeit von der zeitlichen Breite der Zeitkanäle (a) und der periodischen Relativbewegung (b), welcher Proben- und Meßvolumen unterworfen werden, dargestellt. Um geeignete Wertebereiche dieser Parameter zu bestimmen, wurde eine Testprobe verwendet (10 nM, mit den Farbstoffen Rhodamine Green und Cy-5 zweifach markierte dsDNA) und für verschiedene Wertekombinationen je 300 unabhängige Messungen mit einer Meßzeit von je 500 ms durchgeführt. Als Maß für die Detektionsicherheit eine Probe mit zweifach markierten Molekülen richtig zu charakterisieren, wurde die relative Standardabweichung $\sigma/\Delta x_c$ aus der angepaßten Gaußverteilung abgeleitet. Sie gibt das Verhältnis aus der Standardabweichung σ und dem Abstand Δx_c zwischen dem Verteilungszentrum (x_c) und dem Zentrum, welches eine Verteilung besitzen würde, die eine Meßprobe ohne jegliche zweifach markierte Moleküle beschreibt ($x_{c,0}=1$) an. Kleines $\sigma/\Delta x_c$ bedeutet hierbei einen kleinen Überlapp zwischen einer „positiven“, Verteilung und einer „negativen“, Verteilung und somit eine erhöhte Detektionsicherheit. In Abbildung 10 (a) ist $\sigma/\Delta x_c$ für unterschiedliche zeitliche Breiten der Zeitkanäle aufgetragen. Ein Plateau minimaler relativer Standardabweichung bildet sich bei mittleren Werten der Zeitkanalbreite. Bei Zeitkanalbreiten, die im Bereich der Triplettzustands-Lebensdauer der Farbstoffmoleküle liegen ($< 5 \mu s$), steigt $\sigma/\Delta x_c$ an. Ebenso steigt $\sigma/\Delta x_c$ an, wenn die Zeitkanalbreite in den Bereich der mittleren Durchtrittszeit der Moleküle durch das Meßvolumen kommt. Allerdings kann bei Erhöhung der Frequenz der Relativbewegung diese obere Grenze an Zeitkanalbreiten herabgesetzt werden. Abb. 10b zeigt die Abhängigkeit der relativen Standardabweichung $\sigma/\Delta x_c$ von der Frequenz der Relativbewegung zwischen Probenvolumen und Meßvolumen. (Es ist immer die y-Frequenz angegeben. Ist diese nicht Null, geht sie immer mit einer Frequenz von 3 Hz in x-Richtung einher). Es sind Kurven für verschiedene Meßzeiten aufgetragen, die Kanalbreite betrug 12,5 μs . Bei einer nur geringen Frequenz der Relativbewegung ist schon ein sehr starker Abfall der relativen Standardabweichung zu sehen. Der Kurvenverlauf zeigt

eine moderate Verkleinerung von $\sigma/\Delta x_c$ bei zunehmender Frequenz. Im Bereich von 3-246 Hz wird $\sigma/\Delta x_c$ nochmals um etwa einen Faktor 2 verringert, wobei bei der Anlegung von noch höheren Frequenzen noch weitere Verbesserungen zu erwarten sind. Die relativen Standardabweichungen nehmen mit zunehmender Meßzeit ab.

Figur 11 zeigt den optischen Aufbau eines Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationspektrometers mit einer Vorrichtung zur Bewegung der Probe in Form einer Beaufschlagung mit Schwingungen. Parallele Laserstrahlen eines Krypton-Ionen-Lasers mit den Wellenlängen 476/483nm und 647nm passieren ein Wasserstrahl-Objektiv (60x, N.A. ≈ 1.2) in einem Epi-Illuminationsaufbau. Der Probenhalter ist mit einem zweidimensional beweglichen Piezostellenelement verbunden, welches wiederum auf einem mechanischen Hochpräzisions-x-y-Verschiebetisch montiert ist. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt, mittels dichroitischen Spiegel vom Anregungsstrahlengang separiert und mittels einer Linse auf eine Lochblende fokussiert. Die Lochblende variablen Durchmessers ist in der Bildebene der Linse angeordnet und kann in x-, y- und z-Richtung justiert werden. Die Fluoreszenzemission wird parallelisiert, durch einen dichroitischen Spiegel in eine grüne und rote Fraktion separiert und auf zwei Avalanche-Photodioden refokussiert.

Ausführungsbeispiel 1

Verwendete Materialien:

Typ II Restriktionsendonukleasen (E.C. 3.1.21.4) EcoRI (25 U/ μ l), BamHI (10 U/ μ l), SspI (8 U/ μ l) und HindIII (25 U/ μ l) wurden von der Fa. Stratagene (La Jolla, CA) erworben, die Enzymaktivitäten sind in Klammern angegeben. Fluoreszenz-markierte 66 nt Oligonukleotide Cys-

ATGGCTAATGACCGAGATAGGGATCCGAA
 TTCAATATTGTACCTACGGGCTTGCGCTGTATC und RhG-
 GATACGAGCGGCAAGCCCCGTAGGTACCAATATTGAATTCGGATCCCTAT
 1CTCGGTCAATTAGCCAT wurden durch die Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und HPLC-gereinigt, das erste Oligonukleotid weist am 5'-Terminus als Fluoreszenzmarker Cys⁵ (Amersham, UK) auf, während das zweite Oligonukleotid mit Rhodamine Green RhG (Molecular Probes) gelabelt ist. Bei Hybridisierung der beiden komplementären Stränge ergeben sich Erkennungsstellen für BamHI (einfach unterstrichen), EcoRI (doppelt unterstrichen) und SspI (gepunktet). Die Hybridisierung der komplementären Stränge erfolgte bei Konzentrationen von 1 μ M in 100 mM KOAc, 25 mM Tris-Acetat, pH 7,6, 10 mM MgOAc, 0,5 mM β -Mercaptoethanol, 10 μ g/ml BSA unter Erhitzen der Lösung auf 94 °C und anschließendes Abkühlen auf 23 °C mit einem Temperaturgradienten von 1,2 °C/min. Als Resultat entstand ein zweifach-markierter DNA-Doppelstrang mit Erkennungsstellen für BamHI, EcoRI und SspI.

Homogener Restriktionsendonuklease-Assay:

Endonuklease-Assays wurden für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Der Reaktionspuffer enthielt 150 mM KOAc, 37,5 mM Tris-Acetat, pH 7,6, 15 mM MgOAc, 0,75 mM β -Mercaptoethanol, 515 μ g/ml BSA, 0,05 % Triton X-100, 0,5 % Glycerol, 1 - 20 nM gelabeltes DNA-Substrat und überschüssige Anteile (0,08 - 0,25 U/ μ l) an Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, SspI und HindIII.

Optischer Aufbau:

Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines Zweifarb-Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektrometers (Dual-color ConfoCor, C. Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das konfokale Meßvolumen von 0,44 fL wurde durch Überlagerung der Foci eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) gebildet. Die Fluoreszenz-emissionssignale wurden separat unter Verwendung von zwei Avalanche-Photodioden detektiert; im Emissionsstrahlengang befand sich eine konfokal angeordnete Lochblende. Das Spektrometer war mit einem Thermosaten ausgestattet. Der Fokus wurde 100 μ m über dem Boden des jeweiligen Probengefäßes positioniert. Die Meßtemperatur betrug 22 °C. Die Proben wurden in Probenröhrchen im Mikrotiterplattenformat vorgelegt. Hierbei handelte es sich entweder um kontaminationsfrei verschlossene Plastikfolien (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) oder um kommerzielle Deckglaskammern (Nunc, Dänemark).

Kreuzkorrelationsanalyse:

Der theoretische Hintergrund der Kreuzkorrelationsanalyse wurde detailliert von Schwille et al. (Biophys. J. 72, 1878 - 1886, 1997) beschrieben. Auf den Offenbarungsgesamt dieser Publikation wird Bezug genommen. Die Daten der Kreuzkorrelation wurden unter Verwendung eines dreidimensionalen Modells für einzelne diffundierende Partikel evaluiert (Rigler und Widengren, Bioscience 3, 180 - 183, 1990).

$G(0)$ bezeichnet die Korrelationsamplitude bei $\tau = 0$, welche proportional zur Konzentration zweifach-gelabelter Moleküle im zylindrischen Meßvolumen des Radius r_0 und der halben Länge z_0 ist. Der Parameter τ_{diff} steht gemäß der Gleichung $\tau_{diff} = r_0^2/4D$ in einem umgekehrt proportionalen Zusammenhang zum Diffusionskoeffizienten D . Die experimentellen Daten wurden unter Anwendung des Access 2.0 Programms der Fa. FVOTEC BioSystems GmbH mittels nicht-linearem Least-square Marquardt-Fit prozessiert. $G(0)$ war der einzige freie Parameter bei der Evaluierung der Kreuzkorrelationsmessungen. Der Struktur-parameter z_0/r_0 wurde mittels Autokorrelationsmessungen an freier Farbstofflösung ermittelt, die durchschnittliche Diffusionszeit τ_{diff} des Substrates wurde mittels einer 60 s Messung ohne Zusatz von Enzym bestimmt. Beide Parameter wurden im Fitting der Kreuzkorrelationsdaten vorgegeben.

Statistische Evaluierung:

Ein typisches Set Kreuzkorrelationsmessungen enthielt 100 Kurven, welche unter Verwendung von Akkumulationszeiten zwischen 760 ms und wenigen Sekunden aufgenommen wurden. Aus jedem Set wurde die Amplitude $G(0)$, welche mittels Fitting erhalten wurde, in einem Histogramm aufgetragen (Details siehe Figur 3). Die Analyse ergab, daß die $G(0)$ -Verteilungsfunktionen mittels Gauß-Funktion approximiert werden können. Die Mittelwerte der Gauß-Funktionen korrespondieren mit den durchschnittlichen Konzentrationen der Fluorophore, während die Standardabweichungen die Streuung der einzelnen Messungen widerspiegeln. Um ein Maß für die Unterscheidbarkeit der Verteilungsfunktionen zu erhalten, wurde die Überlappungsfläche der gefitteten Gauß-Funktionen durch Integration der Gauß-Funktionen ermittelt. Die Überlappungsflächen wurden standardisiert, so daß ein 100 % Überlapp Gauß-Funktionen mit identischem Mittelwert und identischer Standardabweichung entspricht.

Ausführungsbeispiel 2

Verwendete Materialien:

Die verwendeten Materialien und Versuchsbedingungen entsprachen im wesentlichen in dem Ausführungsbeispiel 1 angegebenen. Allerdings wurde hier als Restriktionsendonuklease nur *EcoRI* verwendet.

Homogener Restriktionsendonuklease-Assay:

Die Endonuklease-Assays wurden für *EcoRI* gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt. Als Referenz wurde eine Probe, der keine Restriktionsendonuklease zugesetzt wurde, verwendet.

Optischer Aufbau

Der Experimentelle Aufbau ist in Abbildung 11 dargestellt. Fluoreszenzanregung erfolgte durch Epi-illumination eines Wasserimmersionsobjektives (UPLAPO 60x/1.2W; Olympus, Japan) mit den Wellenlängen 476/483 nm und 647 nm eines Krypton-Ionen-Lasers (INNOVA 90-K; Coherent, Palo Alto, USA), der im Multimodenmodus betrieben wurde. Der dichroitische Strahlteiler A (AHF Analytischechnik, Tübingen) reflektiert bei <502 nm und 585-655 nm und transmittiert bei 502-585 nm und >655 nm. Zusätzliche Laserlinien bei 531 nm und 568 nm werden mit einem speziell angefertigten Anregungs-/Notch-Filter ($>OD$ 5; AHF Analytischechnik) entfernt. Angegebene relative Laseranregungsenergien für beide Wellenlängen erhält man durch die Kombination eines Farbglas-Absorptionsfilters (BG 40, Andover Corporation, Salem, USA) und eines Abschwächungsfilters (OD 0.6; Spindler & Hoyer, Göttingen). Die Proben wurden in kommerziellen Deckglaskammern vorgelegt (Nunc, Denmark). Der Probenhalter ist mit einem zweidimensional beweglichen Piezostellenelement (Piezosystem Jena) verbunden, welches wiederum auf einem mechanischen Hochpräzisions-x-y-Verschiebeträgereis (Märzhäuser, Weizlar) montiert ist. Die Fluoreszenzphotonen werden am dichroitischen Strahlteiler B

spekttral separiert (58SDCLP02, Omega Optical, Brattleboro, USA) und nach optischer Filterung im roten (667EFLP, Omega) und grünen Kanal (535KDF45, Omega), auf zwei Avalanche-Photodioden (APD) abgebildet (SPCM-AQ 131-FS, EG&G Optoelectronics, Kanada). Die digitalen Pulse der APDs werden entweder von einer Dual Input Multiscaler PC-Karte (MCD-, FAST Com-Tec, München) für die Analyse von Zeitspuren mit hoher zeitlicher Auflösung oder von einer on-board- Prozessor PC-Karte (Adwin-) I.D. Jäger Meßtechnik, Lorsch), welche für eine Online-Datenverarbeitung programmiert werden kann, aufgenommen.

Koinzidenzanalyse:

Zur Ermittlung der Koinzidenz wurden die Photonenzeitsignale der beiden Detektoren von einer Meßkarte simultan aufgenommen und simultan mit einer wählbaren Zeitkanalbreite gerasert. Von den so erhaltenen zwei Zeitspuren wurden nun jeweils zeitgleiche Kanäle miteinander multipliziert, dann die Summe über alle Produkte gebildet, und für eine Normierung durch beide Zeitspur-(Einzel)summen geteilt und mit der Zeitkanal-Gesamtzahl multipliziert:

$$K(n) = \frac{\sum_m N_1(m) N_2(m)}{\sum_m N_1(m) \sum_m N_2(m)} \cdot n$$

wobei n den Index des jeweiligen Zeitkanals (nach aufsteigender Zeit geordnet), n die Gesamtzahl der in einer Zeitspur enthaltenen Zeitkanäle, $N_1(m)$ die Anzahl der Photonenzählereignisse in Zeitspur 1 in Zeitkanal m und $N_2(m)$ die Anzahl der Photonenzählereignisse in Zeitspur 2 in Zeitkanal m angibt.

Auswertung

Der erhaltene Wert K ist das Bewertungsmaß für die betrachtete Probe. Es wird lediglich die *Anzahl* der koinzidenten Ereignisse bewertet. Für total voneinander unabhängige Signale ist K wegen der Normierung 1. Treten Photonen signale in beiden Zeitspuren über das Zufallsmaß hinausgehend gehäuft zeitgleich auf, ist $K > 1$. Je höher K über 1 liegt, desto mehr Koinzidenzen, d.h. zeitgleich registrierte Photonen, in den beiden Zeitspuren treten auf. Letzteres ist ein Maß für denjenigen Anteil der Moleküle, an welche beide Farbstoffspezies gebunden sind.

Statistische Auswertung

Es wurde ebenfalls eine Statistik über die Koinzidenzwerte aufgestellt. Es wurde ebenfalls eine Statistik über die Koinzidenzwerte aufgestellt. Die in je 300 Messungen von Proben aus reinem Substrat und je 300 Messungen von bereits durch Restriktionsendonuklease geschnittenen Proben bei einer Oszillationsfrequenz von 216 Hz und unterschiedlichen Analysezeiten ermittelten Koinzidenzwerte wurden in einem Histogramm aufgetragen (siehe Figur 8). Die Analyse ergab, daß die Koinzidenzwerte durch eine Gauß-Funktion approximiert werden können. Die Mittelwerte der Gaußfunktion verringert um 1 korrespondieren mit den durchschnittlichen Konzentrationen an zweifach gelabeltem Substrat, während die Standardabweichungen die Streuung der einzelnen Messungen widerspiegeln. Um ein Maß für die Unterscheidbarkeit der Verteilungsfunktionen zu erhalten, wurde die Überlappungsfläche der gefitteten Gauß-Funktionen durch Integration der Gauß-Funktionen ermittelt. Die Überlappungsflächen wurden standardisiert, so daß ein 100 % Überlapp Gauß-Funktionen mit identischen Mittelwert und identischer Standardabweichung entspricht.

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Koinzidenzanalyse, wobei
 - die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
 - die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
 - die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Meßvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden,
 - die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale oder hiervon abgeleitete Zeitspuren in beliebiger, im wesentlichen jedoch simultane, Zeitabschnitte mit frei wählbaren Zeitanalbreiten zerlegt werden,
 - die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden,
 - für mindestens einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Koinzidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem im wesentlichen zeitgleichen Zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird
- mindestens eine Statistik der Resultate der Koinzidenzanalyse erstellt wird, und/oder die Resultate einer Schwellwertanalyse unterzogen werden,
- diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.

2. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitanalbreiten größer als die längste Fluoreszenzlebensdauer der mindestens zwei Farbstoffe sind.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitanalbreiten kleiner als die Durchtrittszeit des mindestens einen Problemoleküls durch das Meßvolumen sind.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinheiten unterschiedliche spektrale Detektionsempfindlichkeiten aufweisen.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumenelement $V \leq 10^{-12}$ l ist.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe von mindestens einem Laser beleuchtet wird, der elektromagnetische Strahlung mindestens einer Wellenlänge emittiert, die geeignet ist, die mindestens zwei Farbstoffe anzuregen.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Koinzidenzanalyse online durchgeführt wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeit zur Durchführung der jeweiligen Messung während der Messung individuell angepaßt wird.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Rahmen der Koinzidenzanalyse die Koinzidenz durch die Amplitude $G(t)$ der Kreuzkorrelation ermittelt wird.

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß im Rahmen der Koinzidenzanalyse die Koinzidenz durch logische UND-Verknüpfung ermittelt wird.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Koinzidenz durch Multiplikation gemäß nachfolgender Formel ermittelt wird:

$$K_i(n) = \frac{\sum_j N(m, j)}{\prod_j N(m, j)} \cdot n^{(i-1)}$$

wobei $N(m, j)$ die Anzahl Photonen im Zeitabschnitt m des Detektors j , i die Gesamtzahl der verwendeten Detektionseinheiten und n die Anzahl der Zeitabschnitte innerhalb der Zeitspur bezeichnet.

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Probenvolumen und Meßvolumen relativ zu einander bewegt werden.

13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß Systeme untersucht werden, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet.

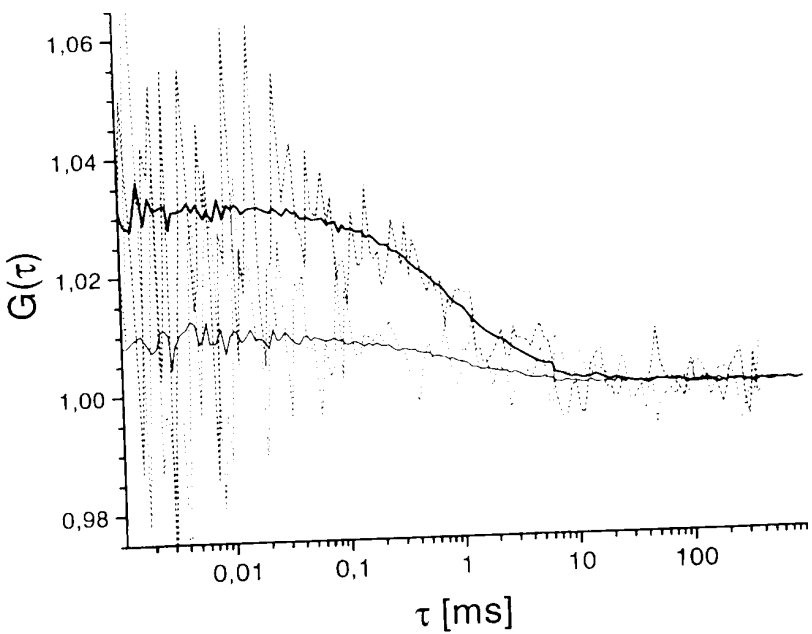


Fig. 1

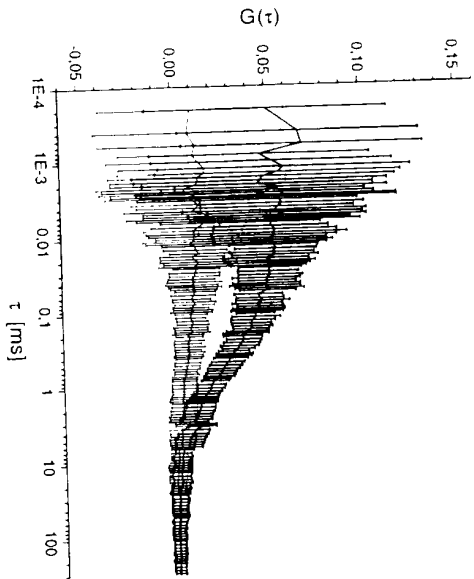


Fig. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

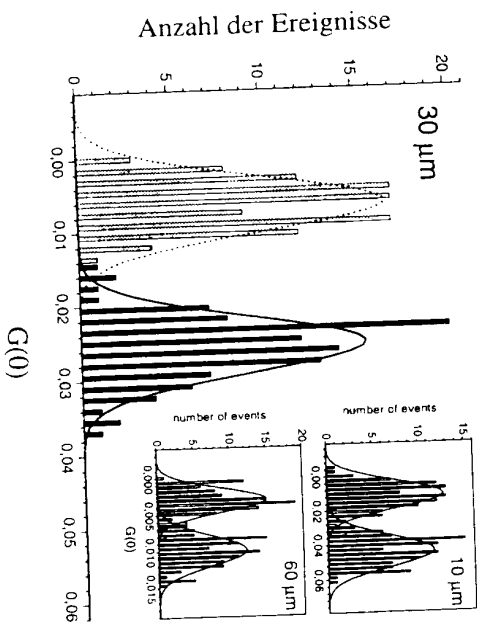


Fig. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

4/11

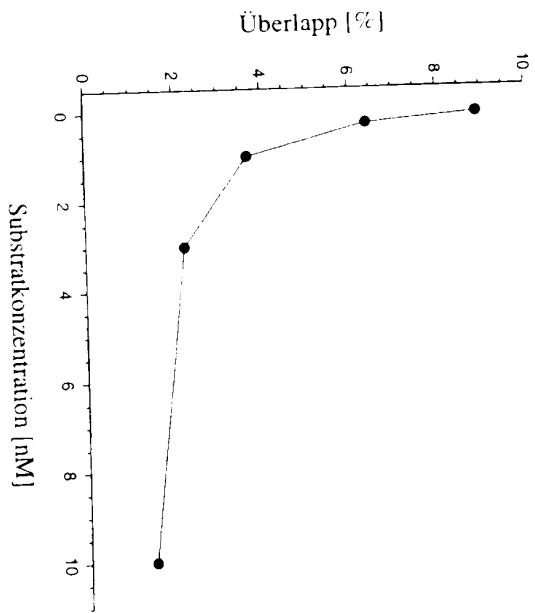


Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/11

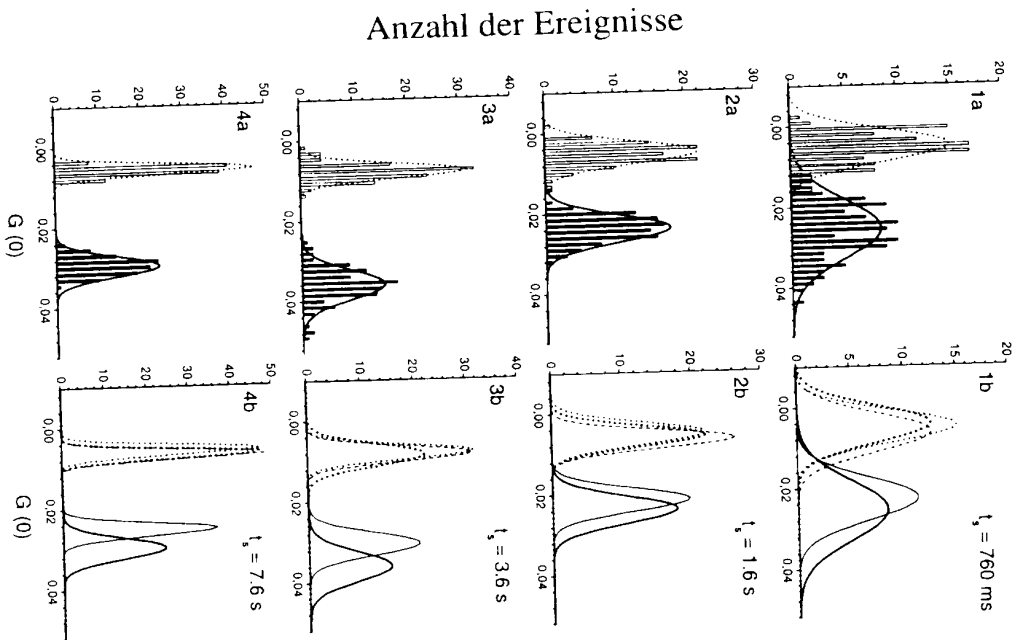


Fig. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/11

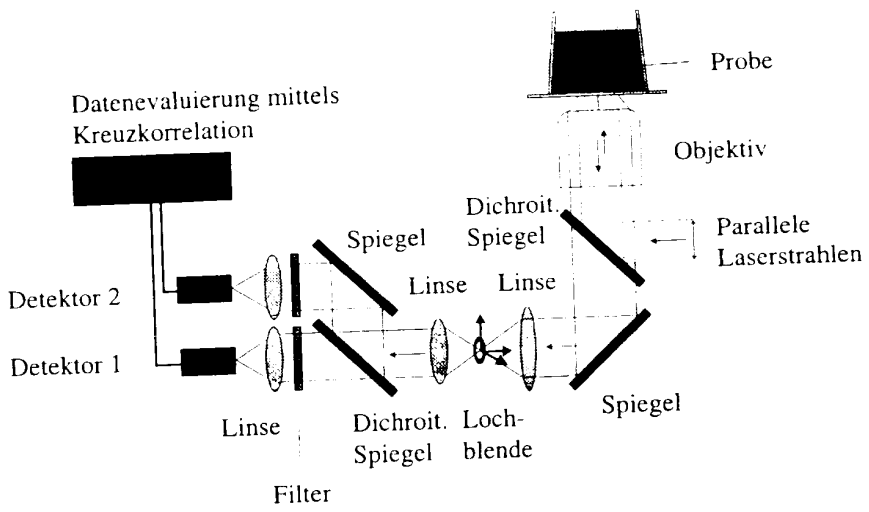


Fig. 6

ERSATZBLATT (REGEL 26)

7/11

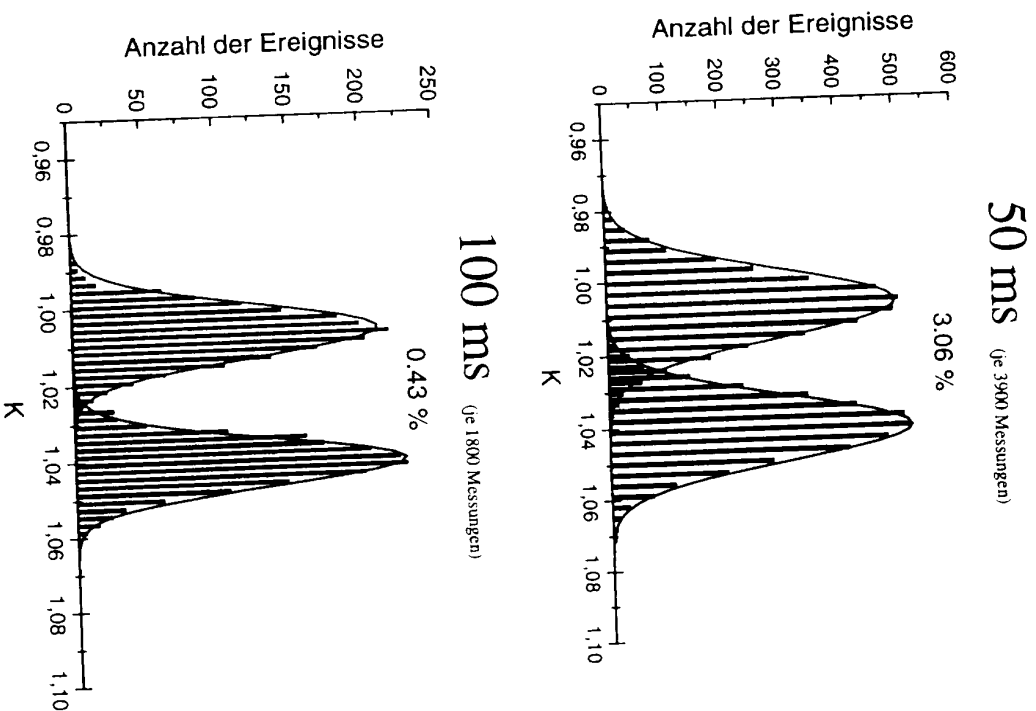


Fig. 7

ERSATZBLATT (REGEL 26)

8/11

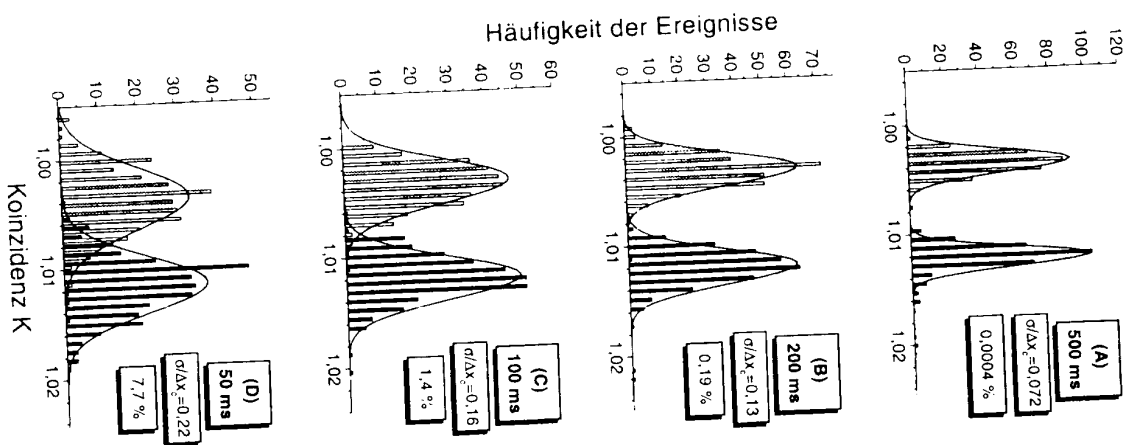
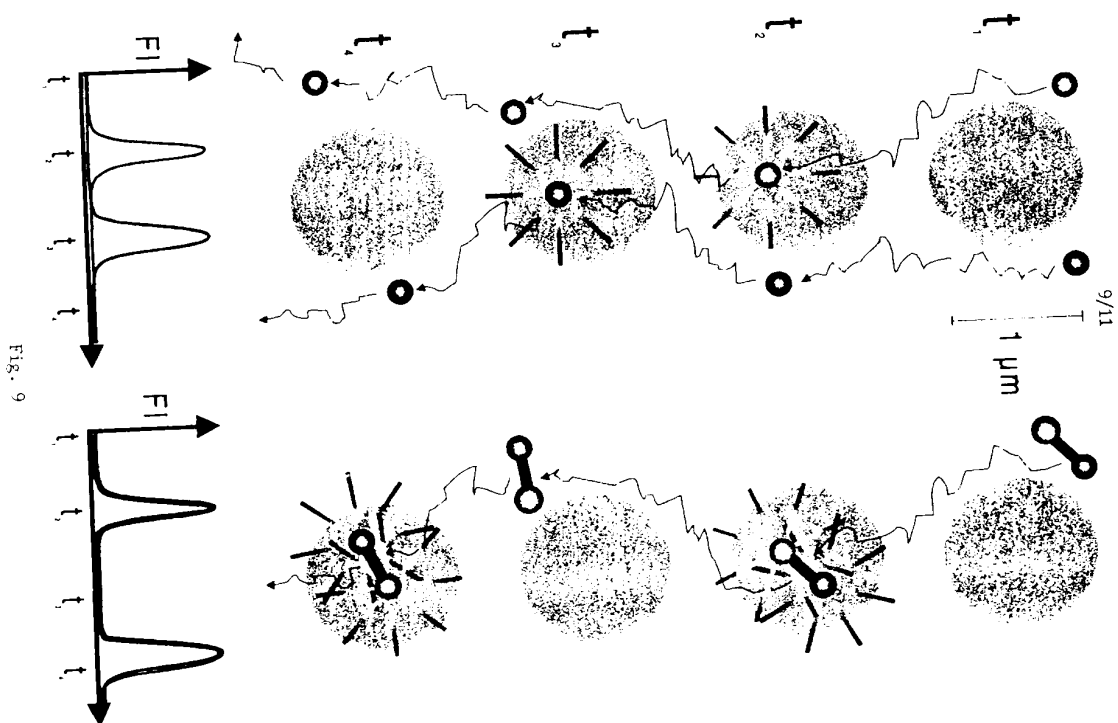


Fig. 8

ERSATZBLATT (REGEL 26)

9/11



ERSATZBLATT (REGEL 26)

10/11

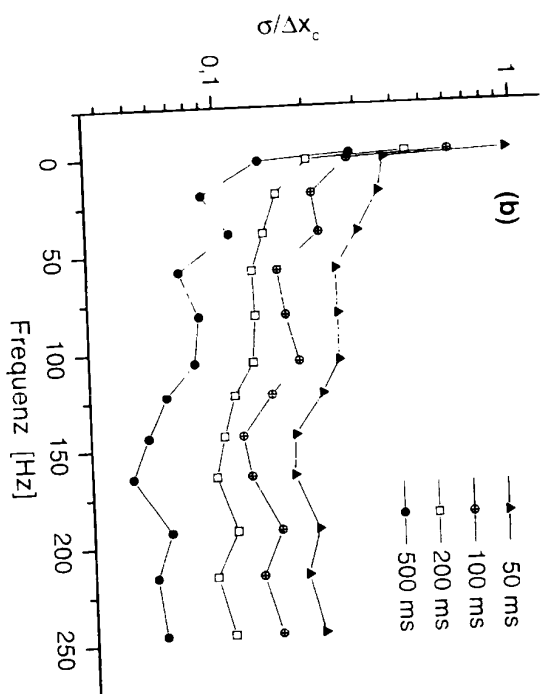
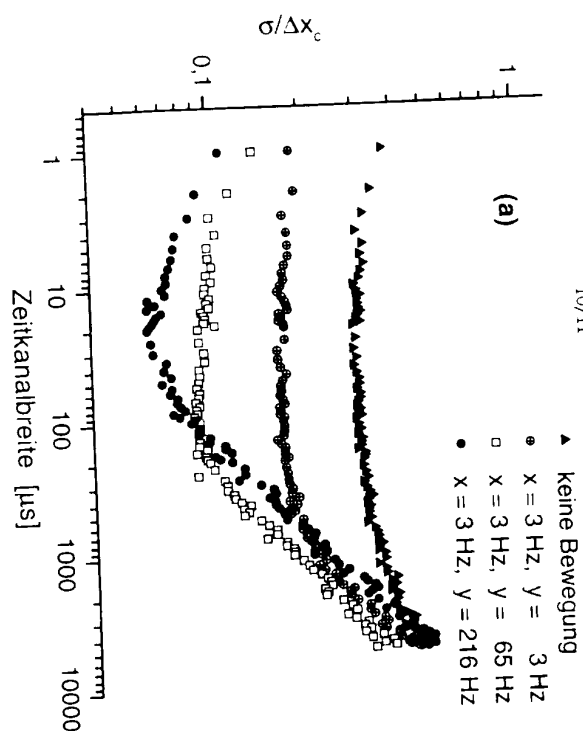


Fig. 10

ERSATZBLATT (REGEL 26)

11/11

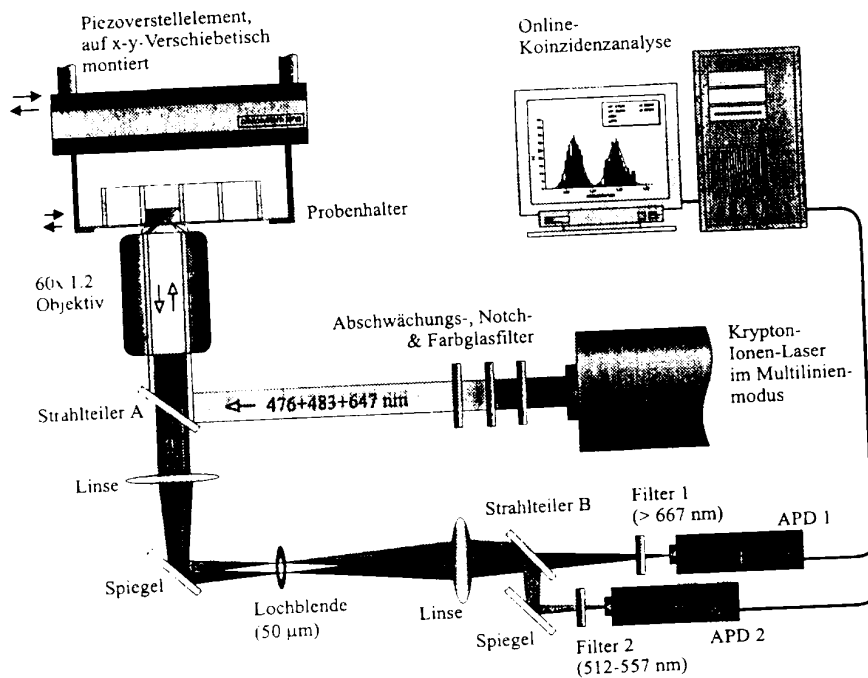


Fig. 11

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/08425

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC), or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Maximum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than maximum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Exhaustive data have been consulted during the international search (listing of said data and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category 1 Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No

P. X EP 0 884 583 A (EVOTEC BIOSYSTEMS)

1, 4-7, 9

16 December 1998
see page 2, line 14 - line 48
see page 3, line 40 - line 41
see page 3, line 49 - page 4, line 44
see page 5, line 14
see page 5, line 58 - page 6, line 1
see page 6, line 30 - line 40
see figures 1, 2

EP 0 359 681 A (UNIVERSITY OF ARKANSAS)

1

21 March 1990
see page 2, paragraph 1
see page 9, line 24 - line 35
see page 10, line 3 - line 15
see claim 7, figure 6

-/-

Relevant family members also listed in Annex

1. Further documents are cited in the context of the following:

- A. Document relating to the general state of the art which is not known to the applicant at the time of filing the international application
- B. Document published on or after the international filing date
- C. Document which may throw doubt on the novelty of the invention as claimed in the international application
- D. Document which may throw doubt on the inventive step of the invention as claimed in the international application
- E. Document which may throw doubt on the industrial applicability of the invention as claimed in the international application
- F. Document published prior to the international filing date but after the priority date claimed
- G. Document mentioned in the international search report

11 May 1999

19/05/1999

Name and mailing address of the ISA
International Patent Office
Tel: (+31) (0) 484 2040 Fax: (+31) (0) 484 2041
Fax: (+31) (0) 346 3010

Authorized officer
THOMAS, R. M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/08425

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category 1 Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No

P. A

EP 0 836 090 A (EVOTEC BIOSYSTEMS)
15 April 1998
see abstract
see column 9, line 38 - line 52

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Patent document cited in search report			Inter national Application No	
Publication date	Publication date	Patent family member(s)	PCT/EP 98/08425	
EP 0884583 A	16-12-1998	WO 9857150 A	17-12-1998	
EP 0359681 A	21-03-1990	DE 68924749 D	14-12-1995	
		JP 2193043 A	30-07-1990	
		US 5502561 A	26-03-1996	
		US 5434667 A	18-07-1995	
EP 0836090 A	15-04-1998	AU 5118398 A	11-05-1998	
		WO 9816814 A	23-04-1998	

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Inter national Application No
PCT/EP 98/08425

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N21/64

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

IPK 6 G01N

Technische aber nicht zum Handelsgut gehörende Erfindungen, soweit diese unter der technischen Gebietsgrenze fallen

Wahrung der internationalen Rechte der Erfindung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile

Als wesentlich angesehen unterliegen

Kategorie: Bezeichnung der Erfindung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile

P. X EP 0 884 583 A (EVOTEC BIOSYSTEMS)

16. Dezember 1998

stehe Seite 2, Zeile 14 - Zeile 48

stehe Seite 3, Zeile 40 - Zeile 41

stehe Seite 3, Zeile 49 - Seite 4, Zeile 44

stehe Seite 5, Zeile 14

stehe Seite 5, Zeile 58 - Seite 6, Zeile 1

stehe Seite 6, Zeile 30 - Zeile 40

stehe Abbildungen 1, 2

EP 0 359 681 A (UNIVERSITY OF ARKANSAS)

21. März 1990

stehe Seite 2, Absatz 1

stehe Seite 9, Zeile 24 - Zeile 35

stehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 15

stehe Anspruch 7; Abbildung 6

11. Mai 1999

Name und Postamt der internationalen Rechercheinrichtung

Europäisches Patentamt, P. B. 5618 Patentreich, D-69110 Mannheim 1, Deutschland

Formblatt PCT/ISA270 (Rev. 2) (Juli 1997)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Titel: neues Anticancer
PCT/EP 98/08425

C (Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie: Beschreibung der Verflechtung, sowie der/derjenigen unter Angabe der in Betracht kommenden Teile

Dat. Ansuchen Nr.

P. A. EP 0 836 090 A (EVOTEC BIOSYSTEMS)
15. April 1998
siehe Zusammenfassung
siehe Spalte 9, Zeile 38 - Zeile 52

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu selben Patentfamilie gehören

Titel: neues Anticancer
PCT/EP 98/08425

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitgliedern der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0884583 A	16-12-1998	WO 9857150 A	17-12-1998
EP 0359681 A	21-03-1990	DE 68924749 D	14-12-1995
		JP 2193043 A	30-07-1990
		US 5502561 A	26-03-1996
		US 5434667 A	18-07-1995
EP 0836090 A	15-04-1998	AU 5118398 A	11-05-1998
		WO 9816814 A	23-04-1998